

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Tamara Vujović

7342/PT

**Utjecaj lovora (*Laurus nobilis* L.) na patogene
mikroorganizme iz skupine *Oomycetes***

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Uspostavni istraživački projekt Hrvatske zaklade za znanost "Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša (InteractOomyc)", UIP-2017-05-6267, voditeljica A. Bielen

Mentor: doc. dr. sc. Ana Bielen

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj lovora (*Laurus nobilis* L.) na patogene mikroorganizme iz skupine

Oomycetes

Tamara Vujović, 0066249172

Sažetak: Mikroorganizmi iz skupine *Oomycetes* česti su uzročnici bolesti biljaka i životinja. Trenutne metode koje su se pokazale učinkovitima u njihovoj kontroli uključuju uporabu toksičnih spojeva poput formaldehida i malahitnog zelenila pa se javila potreba za razvojem novih, manje štetnih tretmana. U ovom radu istraženo je djelovanje ekstrakata lovora (*Laurus nobilis* L.) na rast micelija oomiceta *in vitro* (*Aphanomyces astaci*, kao patogen slatkovodnih rakova, te *Phytophthora cactorum* i *Phytophthora plurivora* kao biljni patogeni). Najveći inhibicijski učinak postignut je u slučaju *A. astaci* (prosječan rast 24 % u odnosu na kontrolu). U suprotnosti s tim, vrste iz roda *Phytophthora* pokazale su otpornost na ekstrakte lovora jer inhibicijski učinak ili nije bio značajan (prosječan rast 96 – 99 %) ili su korišteni ekstrakti djelovali poticajno na rast (prosječan rast 104 – 121 %). Zaključno, ekstrakti lovora bi se u budućnosti mogli koristiti u borbi protiv štetnog djelovanja oomiceta u slatkovodnoj akvakulturi.

Ključne riječi: *Aphanomyces*, lovor, *Oomycetes*, *Phytophthora*

Rad sadrži: 29 stranica, 11 slika, 1 tablica, 56 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Ana Bielen

Datum obrane: 10. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

**The effect of laurel (*Laurus nobilis* L.) on pathogenic *Oomycetes*
Tamara Vujović, 0066249172**

Abstract: Pathogenic oomycetes are often causing infections of plants and animals. Since current methods of their control include toxic chemicals, such as formaldehyde and malachite green, it is desirable to develop new, less harmful treatments. The aim of this study was to test the effect of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaf extracts on the growth of oomycete mycelium *in vitro* (*Aphanomyces astaci*, as freshwater crayfish pathogen, *Phytophthora cactorum* and *Phytophthora plurivora* as plant pathogens). The most significant inhibitory effect was noted in the case of *A. astaci* (growth of 24 % in comparison to the control). On the contrary, *Phytophthora* species were resistant to laurel extracts since the growth was either not significantly retarded (96 – 99 %) or it was even slightly improved (104 – 121 %). In conclusion, laurel leaf extracts could be used for the control of oomycete pathogens in freshwater aquaculture.

Keywords: *Aphanomyces*, laurel, *Oomycetes*, *Phytophthora*

Thesis contains: 29 pages, 11 figures, 1 table, 56 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Asst. Prof. Ana Bielen, PhD

Defence date: September 10th, 2018

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Oomiceti i njihovo štetno djelovanje.....	2
2.1.1. <i>Aphanomyces astaci</i>	3
2.1.2. <i>Phytophthora cactorum</i>	5
2.1.3. <i>Phytophthora plurivora</i>	6
2.2. Postojeće metode kontrole bolesti uzrokovanih oomicetima.....	7
2.3. Razvoj ekoloških metoda kontrole patogenih oomiceta.....	9
2.3.1. Potencijal ekstrakata lista lovora (<i>Laurus nobilis</i> L.) u kontroli patogenih oomiceta	10
3. Materijali i metode.....	12
3.1. Biljni ekstrakti	12
3.2. Uzgoj mikroorganizama.....	12
3.2.1. Priprema krute hranjive podloge PG1	12
3.2.2. Priprema krute hranjive podloge PDA (eng. <i>potato dextrose agar</i>)	13
3.3. <i>In vitro</i> testiranje inhibicijskog učinka.....	14
4. Rezultati	15
5. Rasprava	19
6. Zaključak	22
7. Popis literature	23

1. Uvod

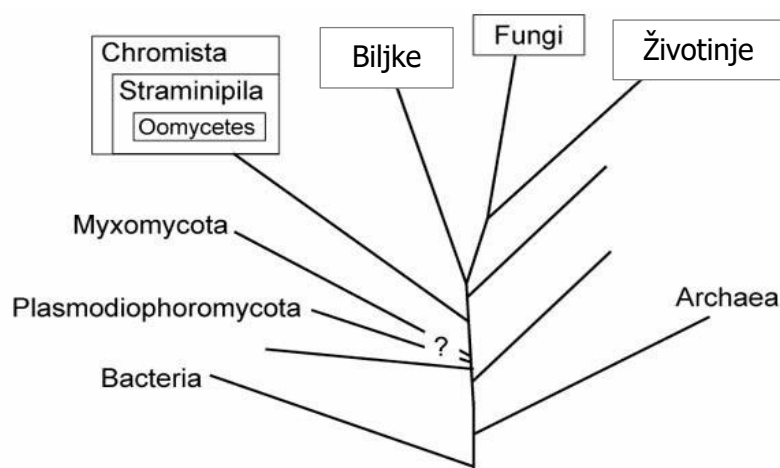
Danas se provode mnogobrojna istraživanja biljnih ekstrakata koji inhibiraju rast i sporulaciju patogenih oomiceta (npr. Curtis i sur., 2004; Dadalioğlu i Evrendilek, 2004; Yusuf i sur., 2005; Soylu i sur., 2006; El Malti i Amarouch, 2009; Dagostin i sur., 2010; Hashemi Karouei i sur., 2012; Rodino i sur., 2013; Afzali i Wong, 2017; Pagliarulo i sur., 2018; Škof, 2018). Lovor (*Laurus nobilis* L.) je mediteranska biljka poznata po svojim antioksidacijskim, antifungalnim i antibakterijskim svojstvima (Al-Hussaini i Mahasneh, 2009), dok njegovo antioomicetno djelovanje gotovo nije istraženo. Jedino istraživanje koje ukazuje na potencijal ekstrakata lovora u inhibiciji rasta oomiceta je istraživanje Soylu i sur. (2006) koji su utvrdili da eterično ulje lovora inhibira vrstu *Phytophthora infestans* koja uzrokuje propadanje usjeva rajčice.

Cilj ovog rada bio je po prvi put istražiti antioomicetno djelovanje ekstrakata lovora na odabrane vrste oomiceta s konačnom svrhom korištenja biljnih ekstrakata u poljoprivredi/akvakulturi. U tu svrhu odabrali smo testne oomicete iz različitih ekosustava (slatkovodni, kopneni) koji uzrokuju bolesti na životinjama/biljkama: *Aphanomyces astaci*, *Phytophthora cactorum* i *Phytophthora plurivora*. Vrsta *A. astaci* je patogeni mikroorganizam i uzročnik bolesti račje kuge (Martín-Torrijos i sur., 2018), dok patogeni roda *Phytophthora* napadaju korijenov sustav mnogih biljaka i uzrokuju uvenuće te u konačnici smrt (Jung i Burgess, 2009).

2. Teorijski dio

2.1. Oomiceti i njihovo štetno djelovanje

Oomiceti (*Oomycetes*) skupina su kopnenih i vodenih eukariotskih mikroorganizama koji se nazivaju i vodenim plijesnima (Heffer Link i sur., 2002). Zbog svog nitastog rasta, hranjenja apsorpcijom i razmnožavanja putem spora, oomiceti su u početku smatrani gljivama, međutim molekularne analize pokazale su da oni ne pripadaju carstvu gljiva (Slika 1.) (Fry i Grünwald, 2010). Naime, iako dijele određene morfološke značajke s gljivama, oomiceti imaju i neke osobine koje ih razlikuju od njih. Primjerice, osnovna gradivna komponenta stanične stijenke oomiceta je celuloza, za razliku od gljiva kod kojih je to hitin. Osim toga, vegetativni micelij oomiceta je diploidan, dok gljive u većini slučajeva imaju haploidni talus (Fawke i sur., 2015).



Slika 1. Filogenetsko stablo na kojem je vidljivo da oomiceti čine izdvojenu skupinu, srodniju algama nego gljivama (Heffer Link i sur., 2002).

Oomiceti su mikroorganizmi koji žive saprofitskim ili patogenim načinom života. Patogene vrste uzrokuju bolesti mnogih vodenih i kopnenih biljaka, kao i velikog broja životinjskih vrsta (Lévesque, 2011).

Među patogenima slatkovodnih životinja najbolje su istražene vrste iz rodova *Saprolegnia* i *Aphanomyces*. Vrste iz roda *Saprolegnia* inficiraju kožu i škrge riba te njihova jajašca u konačnici rezultirajući poremećajima u osmoregulaciji, respiratornom sustavu, a u nekim slučajevima i otkazivanjem organa zaraženih riba. Osim riba, ove vrste oomiceta napadaju i neke vodozemce poput daždevnjaka *Ambystoma maculatum*, žaba *Bufo calamita* i *Rana temporaria* te jajašca žaba *Bufo boreas*. Također, vrste iz roda *Saprolegnia* inficiraju i

slatkovodne rakove uzrokujući pojavu tamnih melaniziranih mrlja na njihovoj površini (Van den Berg i sur., 2013). Račja kuga, čiji je uzročnik *Aphanomyces astaci*, najučestalija je bolest europskih slatkovodnih rakova koja u većini slučajeva uzrokuje njihovu smrt, a može prouzročiti i nestajanje čitavih populacija (Pagliarulo i sur., 2018).

Oomiceti koji su patogeni biljaka uključuju više rodova – *Peronospora*, *Phytophthora* i *Pythium* (Fry i Grünwald, 2010). Među najpoznatijima je rod *Phytophthora* koji uključuje preko 60 vrsta, primjerice vrste *P. lateralis*, *P. ramorum* i *P. cinnamomi* (Hansen, 2015). Oni su patogeni mikroorganizmi koji u prirodi uzrokuju najviše štete na dikotiledonskim, ali i na nekim monokotiledonskim biljkama. Uzrokuju velike ekonomske štete na usjevima krumpira, paprike, rajčice, soje, kao i štete u ekosustavima. Primjerice, *P. infestans* je patogeni mikroorganizam koji na svjetskoj razini uzrokuje milijunske gubitke u proizvodnji krumpira (Kamoun, 2003).

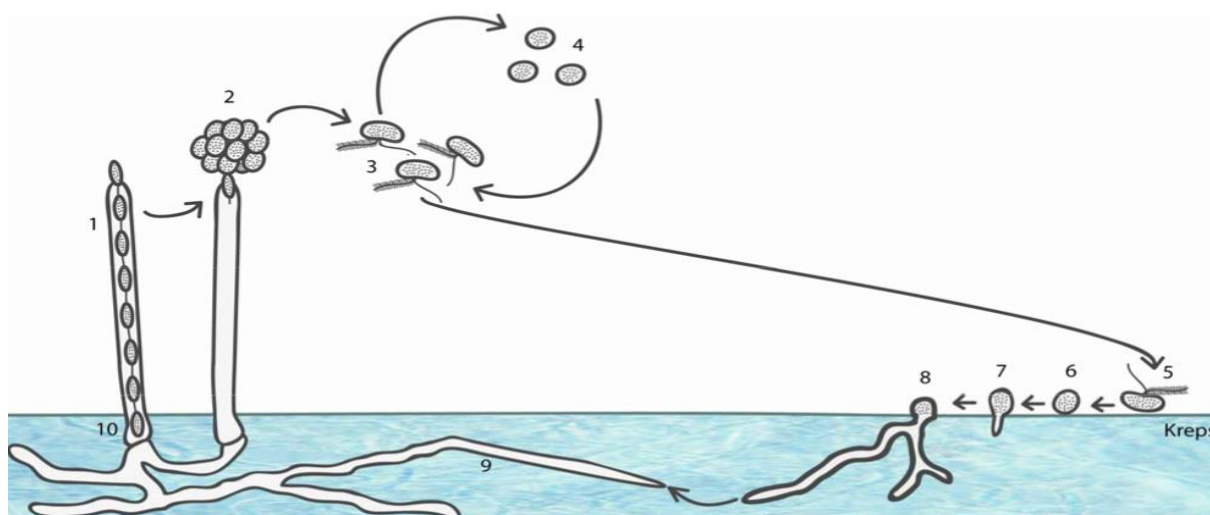
U nastavku teksta detaljnije su opisani patogeni oomiceti koji su korišteni kao modelni organizmi u ovom istraživanju.

2.1.1. *Aphanomyces astaci*

Vrsta *Aphanomyces astaci* patogeni je mikroorganizam i uzročnik bolesti račje kuge koja uzrokuje pomore riječnih rakova na području Europe (Vrålstad i sur., 2011; Martín-Torrijos i sur., 2018). Osim kod prirodnih populacija, *A. astaci* uzrokuje štete i u akvakulturi jer može uzrokovati masovni pomor uzgajanih rakova poput riječnog raka, *Astacus astacus*, i signalnog raka, *Pacifascatus leninsculus*. Osim toga, zaražene životinje nisu pogodne za ljudsku prehranu (Jussila i sur., 2011).

Do prve pojave bolesti račje kuge u Europi došlo je u 19. stoljeću kao posljedica unosa alohtonih vrsta rakova iz Sjeverne Amerike. Unos sjevernoameričkih vrsta slatkovodnih rakova i njihovo nezakonito širenje rezultiralo je epidemijom račje kuge diljem Europe (primjerice u Finskoj, Irskoj, Italiji, Švedskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu). Zbog brzog širenja i izrazito štetnog učinka na faunu slatkovodnih rakova u Europi vrsta *A. astaci* je uvrštena popis 100 najgorih invazivnih vrsta na svijetu. Osim u Europi, pojava račje kuge zabilježena je i na području Japana zbog čega se slatkovodni rak *Cambaroides japonicus* danas nalazi na listi ugroženih životinja (Martín-Torrijos i sur., 2018). Nadalje, račja kuga inficira i endemske vrste rakova na području Južne Amerike (Brazila) poput vrste *Procambarus clarkii* i vrsta iz roda *Parastacus* (*P. defossus* i *P. pilimanus*) (Peiró i sur., 2016).

Vrsta *Aphanomyces astaci* ne pokazuje patogeni učinak prema svim vrstama slatkovodnih rakova jer na području Sjeverne Amerike riječni rakovi žive u zajednici s *A. astaci* koji na njih ne djeluje štetno, dok su europske, azijske i australske vrste riječnih rakova izuzetno podložne infekcijama uzrokovanim ovom vrstom oomiceta te su one za njih smrtonosne (Vrålstad i sur., 2011). Riječni rak (*Astacus astacus*), bjelonogi rak (*Austropotamobius pallipes*), potočni rak (*Austropotamobius torrentium*) i uskoškari rak (*Astacus leptodactylus*) primjeri su europskih vrsta rakova koje su podložne bolesti, dok su signalni rak (*Pacifasticus leniusculus*), crveni močvarni rak (*Procambarus clarkii*) i bodljobrادي rak (*Orconectes limosus*) primjeri sjevernoameričkih vrsta rakova koji su prenositelji bolesti i kod kojih se uglavnom ne razvijaju simptomi bolesti. Kod vrste *A. astaci* je, za razliku od mnogih drugih oomiceta, poznato samo nesporno razmnožavanje, a njezin životni ciklus prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Životni ciklus vrste *A. astaci* (Vrålstad i sur., 2011). Spore nastaju u sporangijima na završecima hifa (1) te se istiskuju kroz vrh hife tvoreći kuglastu nakupinu (2). Spore potom dobiju dva biča te postaju slobodno pokretne zoospore. Otpuštaju se iz sporangija i gibaju u vodi u potrazi za novim organizmom-domaćinom (3). Aktivne su nekoliko dana nakon čega formiraju cistu (4). Ukoliko zoospora kemotaksijom pronade novog domaćina (5), pretvorit će se u cistu koja će proklijati na površini kutikule domaćina (6). U sljedećem koraku (7) pomoću turgora i djelovanjem enzima dolazi do prodiranja hifa kroz kutikulu u organizam (8 – 9) te u konačnici i do razvoja smrtonosne bolesti. Smrt domaćina potiče stvaranje novih spora proizvodnjom hifa/sporangija (10) (Vrålstad i sur., 2011).

U slučaju zaraze sjevernoameričkih vrsta rakova, njihov imunološki sustav ubrzano djeluje i sprječava infekciju organizma rezultirajući pojavom tamnih točaka (tzv.

melanizacija) čiju pojavu uzrokuju hife enkapsulirane u zaraženom raku (Slika 3.) (Vrålstad i sur., 2011).



Slika 3. Signalni rak (*Pacifastacus leniusculus*) s melaniziranim područjima na karpaksu (a) i trbušnoj kutikuli (b) uzrokovanim infekcijom s *A. astaci* (Vrålstad i sur., 2011).

2.1.2. *Phytophthora cactorum*

Phytophthora cactorum je fitopatogena vrsta oomiceta koja može inficirati mnogobrojne drvenaste i zeljaste biljne vrste poput jabuke, kruške, bukve, jagode i kaktusa (Weiland i sur., 2010; Hudler, 2013; Tomić, 2015; Grenville-Briggs i sur., 2017).

Prvotno, 1870. godine, *Phytophthora cactorum* opisana je kao patogen kaktusa, a naknadno je pronađena diljem svijeta na više od 250 biljnih vrsta. Posebnu zabrinutost potiču sve učestaliji izvještaji o pojavama oboljenja čiji je uzročnik upravo *P. cactorum* koji rezultiraju „krvarenjem stabala“ što djeluje štetno na biljku na način da ju oslabi i usmrti. Biljke pogođene ovom bolešću uključuju rodove *Acer*, *Aesculus*, *Betula*, *Castanea*, *Fagus*, *Juglans*, *Liquidambar*, *Ostrya*, *Quercus*, *Salix*, *Tilia* i *Ulmus* koje se u najvećem broju nalaze na području Sjedinjenih Američkih Država i nekih zemalja Europe poput Njemačke, Italije, Engleske te Češke (Hudler, 2013). Nadalje, uzročnik je truleži korijenja, korijenova vrata (Slika 4a) i podzemnog dijela dijela stabljike i jedan od najdestruktivnijih uzročnika bolesti u proizvodnji jagoda (Slika 4b) (Tomić, 2015).



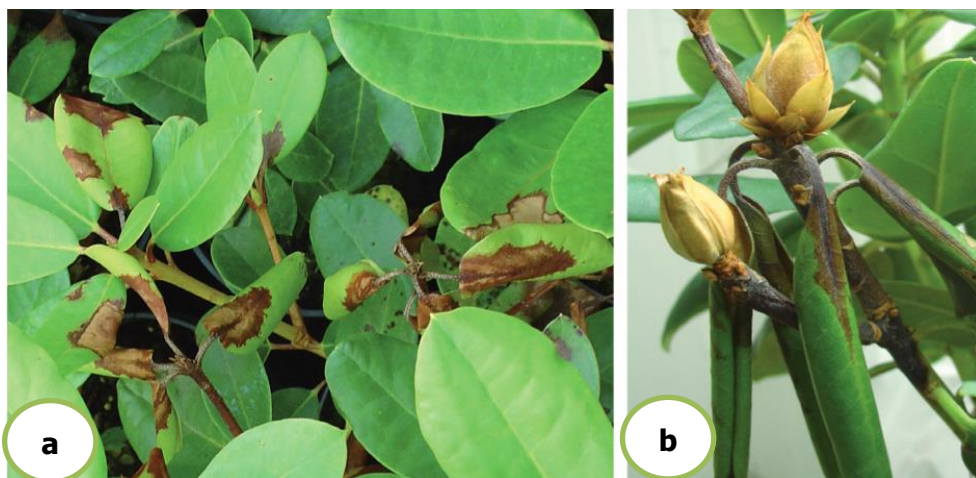
Slika 4. Trulež korijena i korijenova vrata uzrokovan *P. cactorum* (a) i oboljele sadnice jagode (b) (Tomić, 2015).

Epidemiologija *P. cactorum* nije jedinstvena za sve organizme domaćine, već ovisi o vrsti (Rivard, 2007). *Phytophthora cactorum* razmnožava se nesporno i spolno (Heffer Link i sur., 2002). Vrsta je homotalična, odnosno kod spolnog se razmnožavanja oplodnja zbiva na jednom (istom) miceliju i tako nastaje zigota koja se naziva oospora (Slika 5.) i koja je za razliku od zoospora nepokretna (Heffer Link i sur., 2002). Oospore imaju debele stijenke i ostaju vijabilne niz godina, dok u povoljnim uvjetima (u prisutnosti vode) klijaju u kličnu cijev na kojoj dolazi do tvorbe zoosporangija. U njemu nastaju nespodne zoospore koje izlaze i aktivno se kreću kroz vodu pomoću bičeva i obavljaju primarnu infekciju finih korjenčića. Potom se u njima razvija micelij koji raste i s vremenom prelazi u korijen te ga postupno razara i prelazi u korijenov vrat te podzemni dio stabljike. Tijekom kišnih dana na zaraženom korijenu dolazi do tvorbe brojnih sporangija sa zoosporama koji šire zarazu na zdrave biljke (Tomić, 2015).

2.1.3. *Phytophthora plurivora*

Phytophthora plurivora patogeni je mikroorganizam prvotno opisan pod nazivom *Phytophthora citricola* (Sawada, 1927). S vremenom je došlo do identifikacije novih mikroorganizama koji su se nazivali istim imenom, a međusobno su se razlikovali, stoga se javila potreba za novim nazivljem te su primjenom molekularnih, morfoloških i fizioloških karakteristika Jung i Burgess (2009) opisali novu vrstu *P. plurivora* unutar *P. citricola* kompleksa (Orlikowski i sur., 2011).

Ova vrsta oomiceta je trenutno jedan od najučestalijih patogenih finog korijenja drveća poput hrasta i jasena (Slika 6.) (Milenković i sur., 2012).



Slika 6. Štetno djelovanje *P. plurivora* na listove (a) i izdanak (b) rododendrona (Mrázková i sur., 2011).

Phytophthora plurivora je poput *P. cactorum* homotalična vrsta, odnosno vrsta za koju je karakteristična proizvodnja oospora samooplodnjom. Ima brojne domaćine na koje štetno djeluje kako u prirodnim, tako i u umjetnim staništima diljem svijeta. Rasprostranjena je diljem Europe i u različitim okolišnim uvjetima. Osim toga, pronađena je u potocima i tlu na području Sjedinjenih Američkih Država, dok je u manjoj mjeri zastupljena na drugim kontinentima i može se mjestimično naći na područjima Južne Afrike te Australije (Schoebel i sur., 2014).

2.2. Postojeće metode kontrole bolesti uzrokovanih oomicetima

S obzirom na gore naveden raspon domaćina patogenih oomiceta, metode njihove kontrole u najvećoj su mjeri potrebne u akvakulturnom sektoru i biljnoj proizvodnji.

Ribe zaražene oomicetama uzrok su velikih ekonomskih gubitaka u akvakulturi (Derevnina i sur., 2016) i stoga je potrebna primjena određenih metoda radi suzbijanja njihovog rasta. Postojeće metode kontrole rasta oomiceta uglavnom se temelje na primjeni kemijskih agenasa poput malahitnog zelenila (Srivastava i sur., 2004) i drugih fungicida (Ogle, 1997). Malahitno zelenilo organska je boja vrlo učinkovita protiv patogenih oomiceta, međutim upotreba malahitnog zelenila u akvakulturi zabranjena je 2002. godine (Caruana i sur., 2012) zbog njegovog kancerogenog i toksičnog djelovanja (Van West, 2006). Zabranom korištenja malahitnog zelenila javila se potreba za pronalaskom alternativnih sredstava za

suzbijanje rasta vodenih oomiceta i danas se koriste vodikov peroksid, formalin, natrijev klorid te bronopol. Vodikov peroksid (H_2O_2) se u koncentracijama 500 – 1000 ppm pokazao učinkovitim u suzbijanju infekcija uzrokovanih vrstama iz roda *Saprolegnia*, patogenim oomicetama koje napadaju ribe, međutim njegova prisutnost u vodi rezultira smanjenim prinosima u uzgoju kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) odnosno smanjenim brojem jajašaca. Formalin se također pokazao učinkovitim, međutim njegovo korištenje štetno utječe na ljudsko zdravlje i postoji opasnost od njegovog nakupljanja u prevelikim koncentracijama u okolišu uslijed učestale upotrebe. Također, natrijev klorid pokazao se učinkovitim u suzbijanju rasta određenih vrsta oomiceta, međutim puno slabije od formalina i vodikovog peroksida. Bronopol se pokazao učinkovitim protiv mikroorganizma *Saprolegnia parasitica*, no unatoč tome ne koristi se u akvakulturi jer su potrebna dodatna istraživanja koja će dokazati njegovu učinkovitost u industriji (Caruana i sur., 2012). U suzbijanju rasta *Aphanomyces astaci* učinkovitima su se pokazale brojne kemikalije poput formaldehida i već spomenutog zabranjenog malahitnog zelenila, a ostala kemijska sredstva poput vodikovog peroksida, octene kiseline i povidon joda učinkovita su u većim koncentracijama koje mogu biti štetne za vodene životinje (Pagliarulo i sur., 2018).

Inhibicijski učinak na rast vrsta iz roda *Phytophthora* pokazala je grupa fungicida čije su glavne aktivne tvari fenilamidi, acilamini ili acilalanini. Ovi spojevi topljivi su u vodi i stoga u kontaktu s korijenjem dolazi do njihove trenutne apsorpcije. Međutim, kako se nakon kontakta s biljkom fungicidi iz ove grupe kreću prema vrhu biljke, nije moguća kontrola infekcija korijenja biljaka. Nadalje, ova vrsta fungicida selektivno inhibira sintezu ribosomalne RNA te time više utječe na rast micelija nego na klijanje spora kao infektivnog oblika. Fosfonatni fungicidi (soli i esteri fosfonske kiseline koji u otopinama tvore fosfonske anione) također su se pokazali djelotvornima protiv patogenog djelovanja oomiceta iz roda *Phytophthora*, kao i tiazolni fungicid etridiazol koji ima preventivno djelovanje na truljenje korijenja biljaka uzrokovanih vrstama oomiceta iz rodova *Phythium* i *Phytophthora* (Ogle, 1997). Nadalje, fungicid zoksamid čija je glavna aktivna tvar metil-benzamid pokazao se vrlo učinkovit u inhibiciji rasta vrste *Phytophthora infestans*. Inkorporacijom u tkiva zaraženih biljaka zoksamid sprječava daljnju diobu ove vrste oomiceta (Majcen, 2003). Ukoliko se biljka nalazi u ranom stadiju bolesti uzrokovane oomicetom *Phytophthora cactorum*, onda je moguće rješenje čišćenje zaraženog dijela u razini tla i potom premazivanje fungicidima na bazi bakra ili natrijevim cink-kloridom. Također, metalaksil i aluminij-fosetil pokazali su značajno preventivno djelovanje, a mogu se koristiti i u početnim fazama razvoja truleži (Soldo i sur., 2015). Iako su se pokazali učinkovitim u suzbijanju bolesti biljaka i vodenih

organizama uzrokovanih različitim vrstama oomiceta, navedeni spojevi danas se sve manje koriste. Razlozi za to su opasnost od trovanja ljudi i domaćih životinja, kontaminacije stočnih proizvoda, štetnog učinka na kukce (uključujući pčele kao važne oprašivače), mogućnosti zaostajanja i taloženja kemijskih agenasa u prehrambenim proizvodima dobivenima iz prskanih usjeva, kao i ekoloških poremećaja na mikrobiološkoj razini te mogućnosti kontaminacije voda što u konačnici može dovesti do ugibanja vodenih organizama (Ogle, 1997).

2.3. Razvoj ekoloških metoda kontrole patogenih oomiceta

Upotreba biljnih ekstrakata kao bogatih izvora bioaktivnih spojeva poput fenola, flavonoida, kinona, tanina, alkaloida, saponina i sterola mogla bi biti alternativa trenutno korištenim kemikalijama u suzbijanju djelovanja patogenih oomiceta. Postoje brojni primjeri istraživanja u kojima je utvrđeno inhibicijsko djelovanje biljnih ekstrakata ili eteričnih ulja na micelij, sporulaciju ili pokretljivost zoospora patogenih oomiceta (Curtis i sur., 2004; Dadalioğlu i Evrendilek, 2004; Yusuf i sur., 2005; Soyulu i sur., 2006; El Malti i Amarouch, 2009; Dagostin i sur., 2010; Hashemi Karouei i sur., 2012; Rodino i sur., 2013; Afzali i Wong, 2017; Pagliarulo i sur., 2018; Škof, 2018). Primjerice, Afzali i Wong (2017) su u *in vitro* uvjetima dokazali inhibicijski učinak metanolnog ekstrakta biljke *Sonneratia alba* na rast micelija *Aphanomyces invadans*, patogena riba. Nadalje, uzročnik peronosporne vinove loze je oomiceta *Plasmopara viticola* koja se nakon Drugog svjetskog rata tretirala isključivo kemijskim agensima poput bakrovog sulfata, kalijevog silikata i bikarbonata, kalcijevog klorida i dr. (Zanzotto i Morroni, 2016). Međutim, Dagostin i sur. (2010) dokazali su antioomicetno djelovanje alkoholnog ekstrakta kadulje (*Salvia officinalis*) i ekstrakta biljaka *Yucca schidigera* te *Inula viscosa* na *P. viticola*. Dokazani su i inhibicijski učinci alkoholnih ekstrakata bršljana (*Hedera helix*), čička (*Xanthium strumarium*), pelina (*Artemisia* spp.), kadulje (*Salvia officinalis*) i ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) na vrstu *Phytophthora infestans* (Rodino i sur., 2013). Očekivano, njihova djelotvornost ovisila je o primjenjenoj količini i koncentraciji. Nadalje, ekstrakt češnjaka (*Allium sativum* L.) također se pokazao učinkovitim u slučaju vrste *P. infestans* smanjujući učestalost klijanja spora ove vrste oomiceta (Curtis i sur., 2004).

Osim antioomicetnog učinka biljnih ekstrakata, Yusuf i sur. (2005) ispitivali su inhibicijski učinak metanolnih ekstrakata propolisa različitih koncentracija na oomicete *Phytophthora infestans*, *P. capsici* i *P. parasitica* te se pokazalo da je rast micelija ovih

oomiceta bio u potpunosti inhibiran korištenjem većih koncentracija ekstrakata propolisa, dok su ostale korištene koncentracije također imale inhibicijski učinak, ali u manjoj mjeri.

2.3.1. Potencijal ekstrakata lista lovora (*Laurus nobilis* L.) u kontroli patogenih oomiceta

Lovor (*Laurus nobilis* L.) je mediteranska biljka koja je autohtona u primorskom području Hrvatske i u zemljama oko Sredozemnog mora. Raste u obliku drveća ili grmova koji mogu biti visoki do 15 metara i široki do 10 metara. Listovi lovora imaju sjajnu površinu, tvrdi su i duguljastog oblika, tamnozelene boje, zašiljeni s oba kraja (Slika 7.) i dužine do 10 centimetara (Dudaš i Venier, 2009).



Slika 7. Lovor (*Laurus nobilis* L.) (Dudaš i Venier, 2009).

Listovi i eterično ulje dobiveno iz listova lovora koristi se kao začín u prehrambenoj industriji (Simić i sur., 2003), a sami listovi lovora koriste se u prirodnoj medicini zbog svoje farmakološke aktivnosti u tretiranju epilepsije, neuralgije i simptoma Parkinsonove bolesti (El Malti i Amarouch, 2009).

U ekstraktima svježih listova lovora identificirani su 1,8-cineol (ciklički eter i monoterpeni spoj) kao glavni sastojak, zatim α -terpinil acetat (monoterpeni ester), sabineni (biklički monoterpen), α -pineni (alkeni), β -pineni (alkeni), β -elemeni (seskviterpenoidi), α -terpineol (monoterpeni alkohol), linalool (terpeni alkohol) i eugenol (alilbenzen) (Kilic i sur., 2004).

Kivrak i sur. (2017) određivali su ukupne količine fenolnih spojeva i flavonoida ekstrakata lovora u heksanu, etil-acetatu, etanolu i vodi. Rezultati istraživanja pokazali su da su etanolni i etil-acetatni ekstrakti lovora imali veću koncentraciju fenolnih spojeva i flavonoida te bolji antioksidacijski učinak od ostala dva korištena otapala i zaključili da postoji

dobra korelacija između visoke antioksidacijske aktivnosti i visoke koncentracije fenolnih spojeva u ekstraktima lovora.

Postoje brojne studije koje su demonstrirale antibakterijski učinak lovora. Primjerice, Dadalioğlu i Evrendilek (2004) dokazali su inhibicijski utjecaj lovora, to jest njegovih bioaktivnih komponenti na bakterije *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* i *Staphylococcus aureus*. El Malti i Amarouch (2009) su u radu ispitivali djelovanje lovora koji bi se u budućnosti mogao koristiti kao antimikrobno sredstvo u prehrambenim proizvodima jer su zabilježili antibakterijsku aktivnost prema određenim gram-pozitivnim (*Lactobacillus delbrueckii*, *Bacillus cereus* 11778, *Listeria monocytogenes* 4d, *Staphylococcus aureus* 25923) i gram-negativnim bakterijama (*Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteridis*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mitterleuthi*, *Proteus penneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*) koje su uzročnici bolesti kod ljudi koji ih u svoj organizam unesu hranom (Habrún, 2009).

Kemijski sastav lovora i rezultati navedenih istraživanja poticaj su za daljnje istraživanje ekstrakata lovora i utvrđivanje njegovog antioomicetnog djelovanja. Jedini do sad objavljen rad u kojem je istraživano antioomicetno djelovanje ekstrakata lovora je rad Soylu i sur. (2006). Oni su dokazali inhibicijsko djelovanje eteričnog ulja lovora na rast micelija *Phytophthora infestans*, doduše u višim koncentracijama nego što su bile potrebne u slučaju eteričnih ulja drugih biljaka poput origana, timijana ili komorača. Djelovanje na druge oomicete tek treba istražiti što je bila i tema ovog rada.

3. Materijali i metode

3.1. Biljni ekstrakti

U radu su korišteni ekstrakti lovora (*Laurus nobilis* L., porodica Lauraceae), ranije pripremljeni u Laboratoriju za analitičku kemiju (doc. dr. sc. Maja Dent). Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva iz lovora provedena je klasičnom ekstrakcijom uz refluksiranje na temperaturi ključanja otapala i u trajanju od jednog sata. Pritom su se za ekstrakciju koristila sljedeća otapala: destilirana voda, 96 %-tni etanol (KEFO d.o.o.), 48 %-tni etanol, 100 %-tni metanol (J. T. Baker) i 50 %-tni metanol. Nakon toga su ekstrakti upareni do suhog i potom razrijeđeni kako bi u konačnici dobili 10 puta ugušćene ekstrakte. Koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktima kretala se od 633 do 1147 mg GAE/g (Tablica 1).

Tablica 1. Koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktima lista lovora korištenima u ovom radu.

Otapala	Ukupni fenoli (mg GAE/g)
96 %-tni etanol	633
48 %-tni etanol	1147
100 %-tni metanol	888
50 %-tni metanol	1062

3.2. Uzgoj mikroorganizama

U istraživanju su korišteni sljedeći patogeni mikroorganizmi iz skupine *Oomycetes*: *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1906), *Phytophthora cactorum* (Lebert i Cohn, 1870) i *Phytophthora plurivora* (Jung i Burgess, 2009).

Mikroorganizmi su uzgajani pri 18 °C na dvije vrste hranjivih podloga: PDA (eng. *potato dextrose agar*) za oomicete iz roda *Phytophthora* i PG1 za *A. astaci*.

3.2.1. Priprema krute hranjive podloge PG1

Kruta hranjiva podloga PG1 (Unestam, 1965) priprema se miješanjem pet različitih otopina, pri čemu se prvo svaka komponenta pripremi zasebno, sterilizira i tek se na kraju pomiješaju određeni volumeni pojedinih komponenti prema zadanom redoslijedu.

Otopina 1 sadrži 3 g Bacto peptona (BD Biosciences) otopljenog u 100 mL destilirane vode.

Otopina 2 sadrži 6 g D (+) glukoza monohidrata (Sigma) otopljenog u 100 mL vode.

Otopina 3 sadrži:

- 1,70 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (Sigma);
- 1,45 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Sigma);
- 0,20 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (Sigma);
- 3,70 g KCl (Sigma);
- 0,55 g dinatrijeve soli etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) (Sigma)

otopljenih u 1000 mL destilirane vode.

Otopina 4 je fosfatni pufer čiji je pH = 7,0, a dobije se miješanjem:

- otopine A: 0,067 M (9,5 g/L) Na_2HPO_4 (Sigma)
- otopine B: 0,067 M (9,2 g/L) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Sigma).

Pripremljene otopine potrebno je zasebno sterilizirati i nakon autoklaviranja pomiješati 611 mL otopine A i 389 mL otopine B.

Otopina 5 sadrži 12 g agara (Biolife) otopljenog u 600 mL vode.

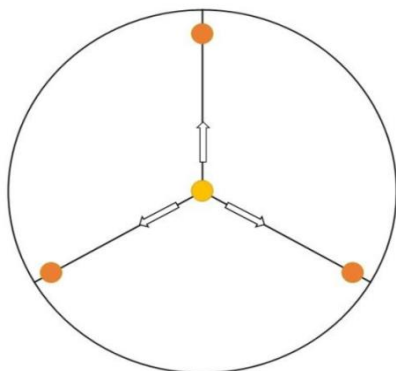
Svih pet otopina potrebno je zasebno autoklavirati pri temperaturi 121 °C kroz 15 minuta i potom ohladiti na temperaturu od oko 45 °C te pomiješati sljedećim redoslijedom kako ne bi došlo do precipitacije. Prvo se u 600 mL otopine 5 polako dodaje 100 mL otopine 4, zatim jednaki volumen otopine 3, potom otopina 1 i na kraju 100 mL otopine 2. Pripremljena otopina volumena 1 L dovoljna je za pripremu otprilike 40 Petrijevih zdjelica s krutom hranjivom podlogom ako se sterilno u svaku zdjelicu izlije otprilike 25 mL hranjive podloge.

3.2.2. Priprema krute hranjive podloge PDA (eng. *potato dextrose agar*)

Sastav PDA podloge je 5 g/L krumpirovog ekstrakta, 20 g/L glukoze i 17 g/L agara (Biolife). Za pripremu PDA hranjive podloge potrebno je 42 g smjese suspendirati u 1000 mL hladne destilirane vode, zagrijati smjesu do vrenja uz često miješanje i sterilizirati autoklaviranjem pri 121 °C kroz 15 minuta. Sterilizirana otopina se ohladi na 45 – 50 °C, promiješa i sterilno izlije u Petrijeve zdjelice (otprilike 25 mL otopine/zdjelici).

3.3. *In vitro* testiranje inhibicije radijalnog rasta oomiceta

Testovima na krutim hranjivim podlogama PG1 (*A. astaci*) i PDA (*P. plurivora* i *P. cactorum*) ispitana je *in vitro* inhibicija rasta navedenih mikroorganizama u prisutnosti pripremljenih ekstrakata lovora.

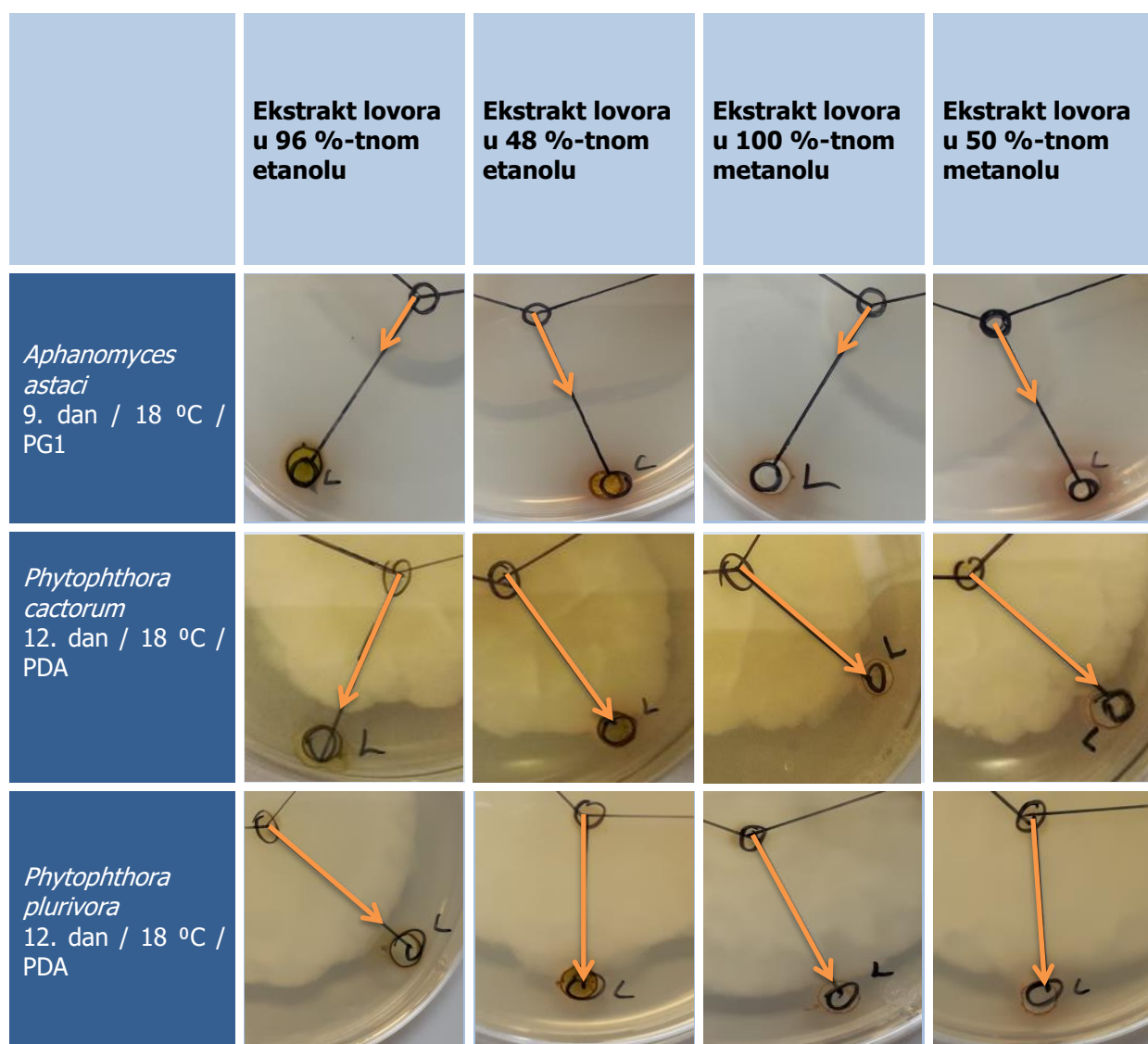


Slika 8. Mjerenje radijalnog rasta oomiceta. Žuto – početak rasta micelija oomiceta; narančasto – bunari koji sadrže po 50 μ L biljnog ekstrakta; strelice – smjer radijalnog rasta micelija.

Na krutim hranjivim podlogama načinjena su tri „bunara“ (na Slici 8. označeni narančastom bojom) u koje je dodano po 50 μ L pripremljenih biljnih ekstrakata, dok je u sredinu Petrijeve zdjelice (na Slici 8. označeno žutom bojom) postavljen kružni komadić krute hranjive podloge (d = 5 mm) s određenom vrstom oomiceta. Potom su Petrijeve zdjelice s mikroorganizmima inkubirane kroz 9 (*A. astaci*) odnosno 12 (*Phytophthora*) dana pri 18 °C te je 3., 6., 9. i 12. dan izmjeren radijalni rast micelija oomiceta u mm, od središta Petrijeve zdjelice do vanjskog ruba micelija. Rast je uspoređen s negativnim kontrolama (ploče s čistim otapalima) kako bi se utvrdio intenzitet inhibicije rasta micelija uzrokovan biljnim ekstraktima lovora.

4. Rezultati

Kako bi se utvrdilo mogu li ekstrakti lovora inhibirati rast micelija odabranih patogenih oomiceta, provedena su *in vitro* testiranja na krutim hranjivim podlogama (Slike 9., 10. i 11.). Vidljivo je da je radijalni rast *A. astaci* u prisutnosti ekstrakata lovora u svim slučajevima bio sporiji nego rast vrsta iz roda *Phytophthora* (Slika 9.)

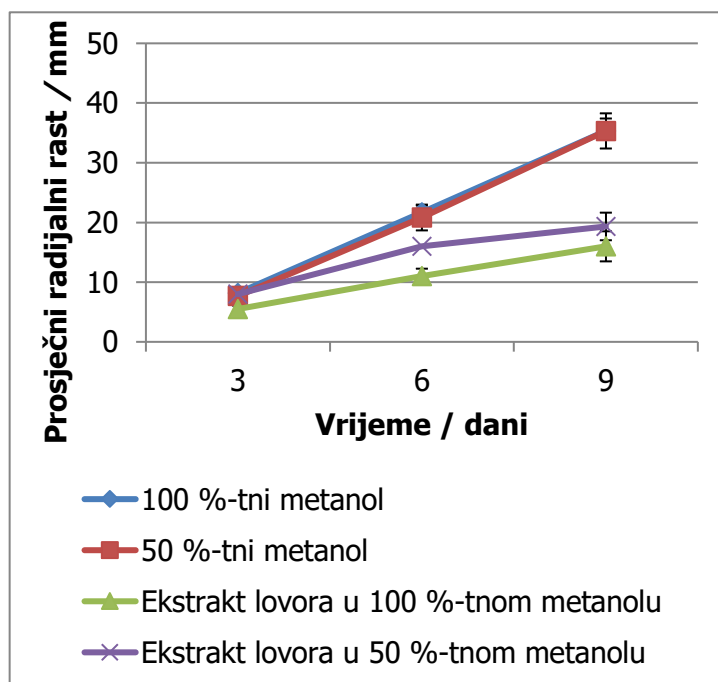
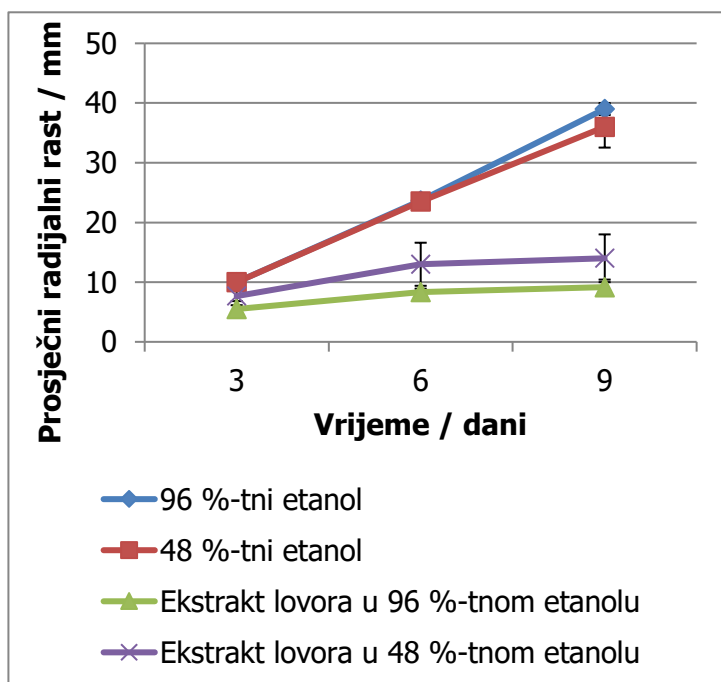


Slika 9. Radijalni rast oomiceta (označen strelicom) u prisutnosti ekstrakata lovora. U prisutnosti čistih otapala (negativne kontrole) mikroorganizmi su u navedenom vremenu narasli do bunara u Petrijevim zdjelicama (nije prikazano).

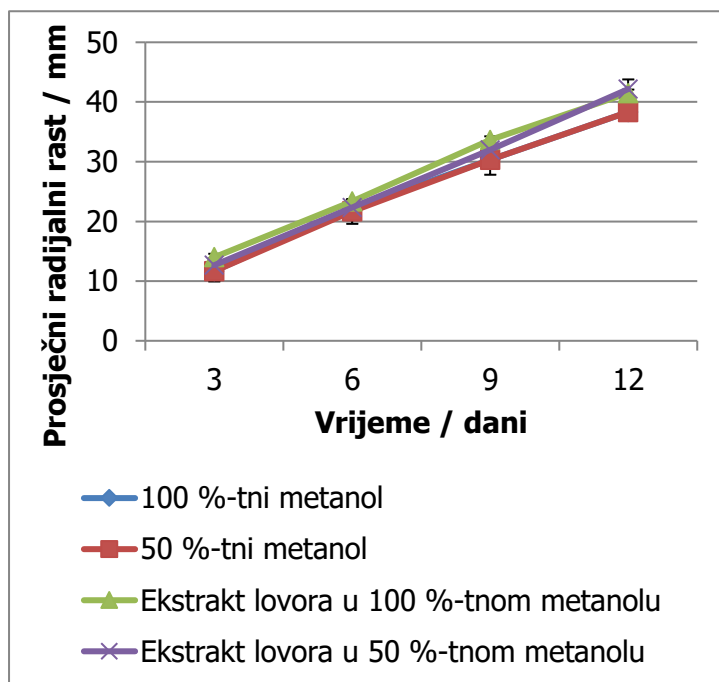
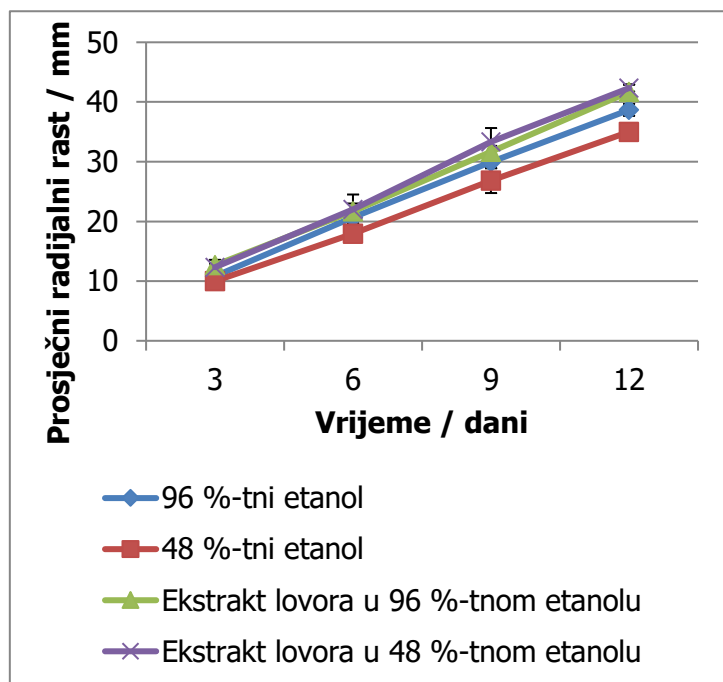
Brzina rasta micelija *A. astaci* bila je najmanja u prisutnosti ekstrakata lovora u 96 i 48 %-tnom etanolu (Slika 10a lijevo), dok je inhibicijski učinak ekstrakata lovora u metanolu bio nešto slabiji, što se vidi iz strmije krivulje radijalnog rasta (Slika 10a desno). U oba slučaja inhibicijski učinak je bio veći kod čistih alkoholnih ekstrakata (96 %-tni etanol, 100

%-tni metanol) nego kod ekstrakata u alkoholnim otapalima razrijeđenima vodom (48 %-tni etanol, 50 %-tni metanol). Također, na kraju pokusa je utvrđeno da je *A. astaci* izložen ekstraktu lovora u 96 %-tnom etanolu imao najmanji prosječan rast, tek 23,51 % u odnosu na kontrolu, dok je inhibicija radijalnog rasta u prisutnosti ostalih korištenih ekstrakata lovora bila nešto slabija (Slika 11a). Tako je prosječan rast u prisutnosti ekstrakta lovora u 48 %-tnom etanolu iznosio 38,89 %, zatim ekstrakta lovora u 100 %-tnom metanolu 45,29 % i u slučaju ekstrakta lovora u 50 %-tnom metanolu 54,71 % (Slika 11a).

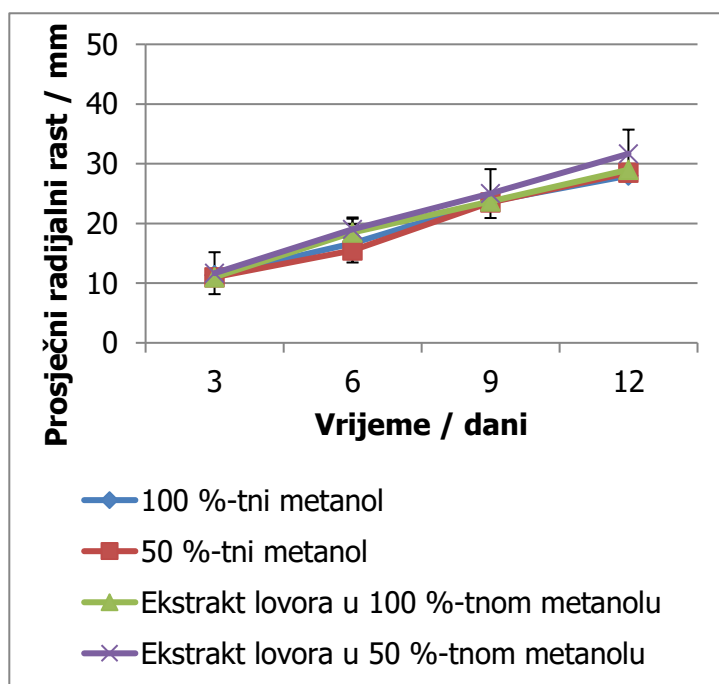
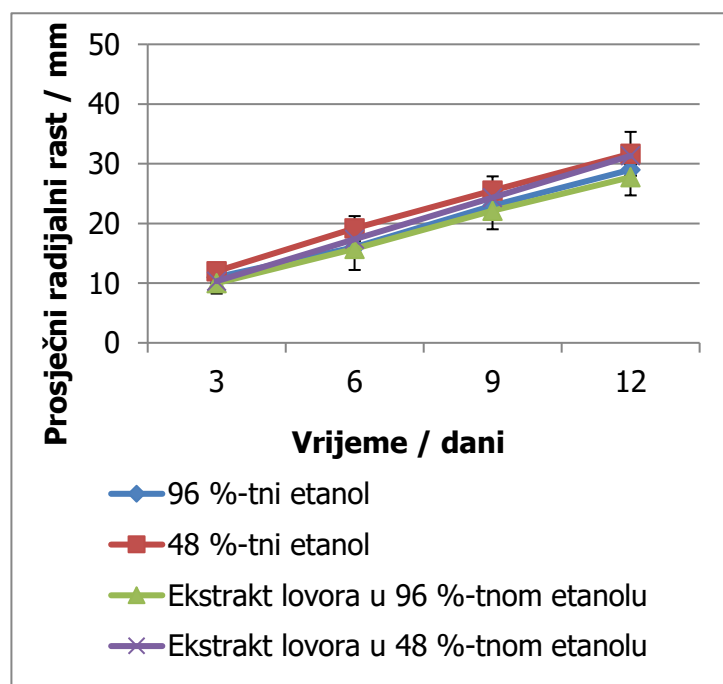
Nasuprot tome, krivulje rasta vrsta iz roda *Phytophthora* u prisutnosti ekstrakata lovora bile su usporedive s krivuljama rasta u prisutnosti čistih otapala, odnosno niti kod etanolnih niti kod metanolnih ekstrakata nije došlo do inhibicije rasta (Slika 10b i 10c). Štoviše, u nekim je slučajevima brzina rasta bila nešto veća u prisutnosti ekstrakata lovora nego u prisutnosti čistog otapala, točnije u slučaju *P. cactorum* svi korišteni ekstrakti lovora rezultirali su većom brzinom rasta, dok je kod *P. plurivora* do te pojave došlo prilikom korištenja ekstrakata lovora u 100 i 50 %-tnom metanolu (Slike 11b i 11c). Tako je na kraju pokusa utvrđeno da je *P. cactorum* izložen ekstraktu lovora u 48 %-tnom etanolu imao prosječan rast čak veći od kontrole (120,94 %) ili u prisutnosti ekstrakta lovora u 50 %-tnom metanolu kod kojeg je prosječan rast iznosio 110 % (Slika 11b). Ovi rezultati pokazuju blago poticajno djelovanje ekstrakata lovora na rast biljnih patogena *P. cactorum* i *P. plurivora*, s tim da je ovaj učinak bio izraženiji kod *P. cactorum*.



a) *Aphanomyces astaci*

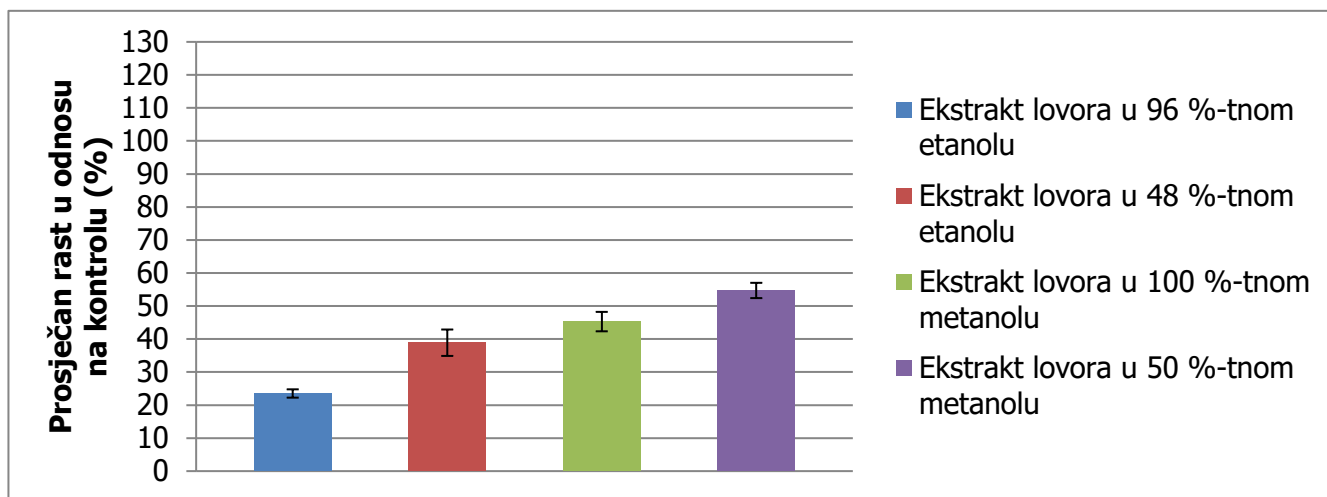


b) *Phytophthora cactorum*

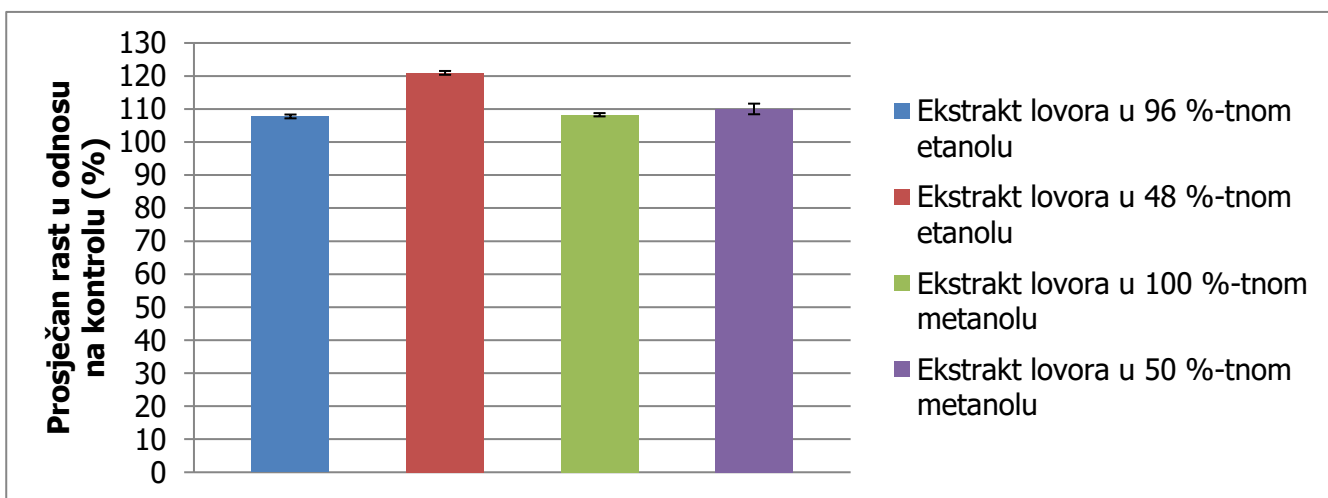


c) *Phytophthora plurivora*

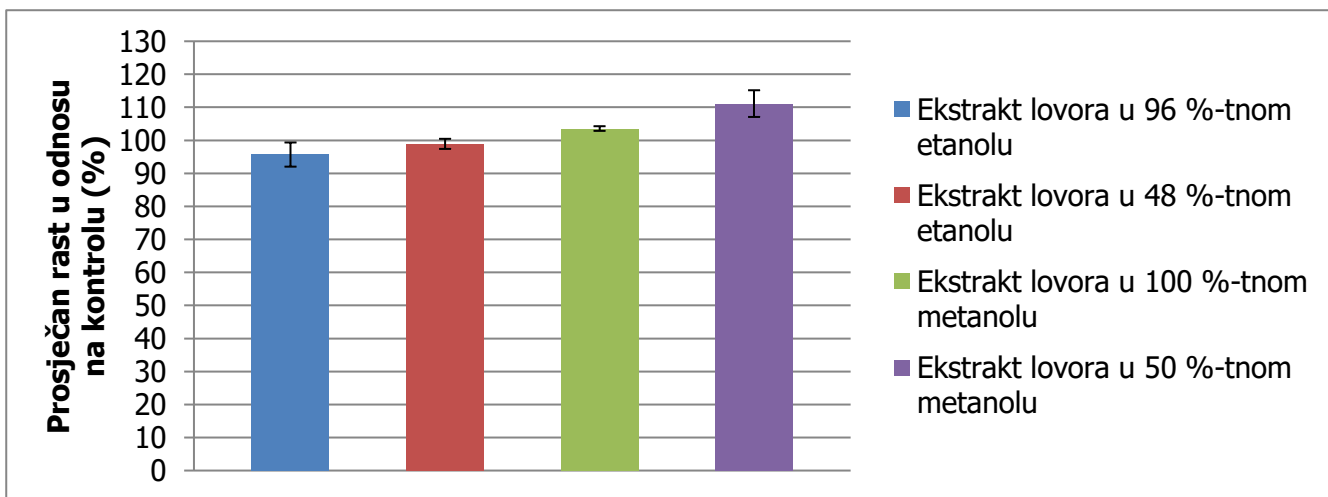
Slika 10. Krivulja rasta testiranih mikroorganizama u prisutnosti ekstrakata lovora. Prikazane su prosječne vrijednosti 3 - 6 ponavljanja \pm standardna devijacija.



a) *Aphanomyces astaci*



b) *Phytophthora cactorum*



c) *Phytophthora plurivora*

Slika 11. Rast micelija oomiceta (%) u prisutnosti ekstrakata lovora. Rast je prikazan kao postotak radijalnog rasta u odnosu na pripadajuće negativne kontrole nakon 9 (*A. astaci*) odnosno 12 dana (*Phytophthora* sp.). Prikazane su prosječne vrijednosti 3 - 6 mjerenja \pm standardna devijacija.

5. Rasprava

Ovo je prvo istraživanje u kojem je demonstrirana raznolikost učinka ekstrakata lovora na razne vrste patogenih oomiceta, koja je u vezi s vrstom domaćina na kojima parazitiraju. S jedne strane pokazana je značajna inhibicija animalnog patogena *A. astaci*, dok su biljni patogeni iz roda *Phytophthora* pokazali otpornost na bioaktivne tvari prisutne u ekstraktima lovora. Štoviše, u većini slučajeva ekstrakti lovora su se čak pokazali poticajnim za njihov rast (prosječan rast premašuje kontrolna mjerenja). U usporedbi s tim, istraživanje Soyula i suradnika (2006) pokazalo je da eterično ulje lovora ima određeni inhibicijski učinak na srodnu vrstu *Phytophthora infestans* iako je bilo potrebno primijeniti više koncentracije nego u slučaju drugih eteričnih ulja, poput ružmarina i lavande. Ova razlika u rezultatima može se objasniti time što su eterična ulja puno koncentriranija od biljnih ekstrakata korištenih u ovom radu. Nadalje, temeljem naših rezultata može se pretpostaviti da bi testirane vrste *P. cactorum* i *P. plurivora* mogle biti parazit na lovoru, iako to do sada nije eksperimentalno potvrđeno, i da su zbog toga razvile otpornost na djelovanje bioaktivnih komponenti ekstrakata lovora. Tome u prilog govori činjenica da vrste *Phytophthora cactorum* i *Phytophthora plurivora* inficiraju širok raspon raznolikih biljnih vrsta. Neki potvrđeni domaćini vrsta *P. cactorum* i *P. plurivora* su šumski bor (*Pinus sylvestris* L.) (Tkaczyk i sur., 2016), dok su u slučaju *P. cactorum* to još i europska bukva (*Fagus sylvatica*) (Grenville-Briggs i sur., 2017) te voćke poput jabuke, kruške i jagode (Hudler, 2013). S druge strane, vrste iz roda *Phytophthora* su česti paraziti na lovoru. Primjerice, u jednom istraživanju provedenom u Španjolskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu zabilježeno je da je 8 od 9 biljaka vrste *Laurus nobilis* bilo domaćin za vrste iz roda *Phytophthora* i to je u većini slučajeva bila *P. cinnamomi* (Jung i sur., 2015). Osim toga, za neke vrste ovog roda, poput *Phytophthora citricola*, dokazano je da inficiraju listove lovora (Crepel i sur., 2005). Temeljem svega ovoga moguće je pretpostaviti da bi ovdje testirane vrste mogle također biti patogeni lovora i da u tome leži razlog njihove otpornosti na biljne ekstrakte lovora. Trebalo bi provesti dodatna istraživanja da se potvrdi ili opovrgne ova hipoteza. Čak i ako to nije točno, mnoge biljne vrste sadrže iste bioaktivne spojeve. Glavni sastojak koji je detektiran u eteričnom ulju lovora je 1,8-cineol koji je pronađen i u eteričnim uljima brojnih drugih biljaka poput, primjerice, biljke *Eucalyptus globulus* (Juergens, 2014). Stoga bi otpornost oomiceta iz roda *Phytophthora* na ekstrakte lovora mogla biti posljedica nespecifične otpornosti na biljne sekundarne metabolite stečene tijekom duge koevolucije sa širokim rasponom biljnih domaćina, jer se isti spojevi javljaju kod različitih biljnih vrsta.

Ovo je prvo istraživanje u kojem je dokazan inhibicijski učinak ekstrakata lovora na oomicetne patogene u slatkovodnim ekosustavima. Ovo predstavlja vrlo obećavajući rezultat s obzirom na novi trend primjene biljnih ekstrakata u akvakulturi radi očuvanja okoliša. Bioaktivne komponente biljaka poput alkaloida, terpenoida i flavonoida djeluju stimulirajuće na imunološki sustav riba i školjaka, a u isto vrijeme imaju i antimikrobno djelovanje (Reverter i sur., 2014).

Kako bi se utvrdile aktivne komponente koje uzrokuju demonstrirani inhibicijski učinak ekstrakata lovora potrebna su dodatna istraživanja. Za ekstrakte korištene u ovom radu bili su poznati podaci o koncentraciji ukupnih fenola, međutim ona nije bila u korelaciji s inhibicijskim učinkom. Primjerice, najmanji prosječni radijalni rast u odnosu na kontrolu bio je zabilježen kod *A. astaci* u prisutnosti ekstrakta lovora u 96 %-tnom etanolu, a ne kod razrijeđenih metanolnih i etanolnih ekstrakata koji su bili najbogatiji ukupnim fenolima. Ovo ukazuje na to da nije presudna ukupna količina fenola u korištenim ekstraktima, već pojedini bioaktivni spojevi kojih je bilo više u etanolnim nego u metanolnim ekstraktima. U skladu s tim, Al-Hussaini i Mahasneh (2009) su također istraživali antimikrobno djelovanje ekstrakata lovora priređenih uz pomoć različitih otapala, između ostaloga i etanola i metanola. Ispitivali su djelovanje ekstrakata lovora na gram-pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*), gram-negativne bakterije (*Salmonella typhimurium* i *Klebsilla pneumoniae*), gljive (*Aspergillus fumigatus* i *Aspergillus niger*) i kvasce (*Candida glabrata* i *Candida albicans*). Također su došli do zaključka da su za antimikrobno djelovanje korištenih ekstrakata odgovorne određene molekule čija prisutnost u ekstraktu ovisi o korištenom otapalu.

Osim ekstrakata lovora, ekstrakti drugih biljnih vrsta za koje je do sad pokazano inhibicijsko djelovanje na rast micelija *A. astaci* su *Zanthoxylum rhoifolium* (Pagliarulo i sur., 2018) te ljekovita kadulja, *Salvia officinalis* (Škof, 2018). Pagliarulo i sur. (2018) su u svom radu, između ostaloga, ispitivali etanolne i metanolne ekstrakte biljaka iz roda *Zanthoxylum* u različitim koncentracijama na patogene akvatične oomicete *A. astaci* i gljive *Fusarium avenaceum*. Pritom su i etanolni i metanolni ekstrakti pokazali inhibicijsko djelovanje na korištene mikroorganizme odnosno na njihovo preživljavanje i sporulaciju već pri nižim koncentracijama ekstrakata te su djelovanje korištenih ekstrakata pripisali prisutnosti alkaloida i flavonoida kao glavnih komponenti u sastavu biljaka iz roda *Zanthoxylum*. S druge strane, Škof (2018) je ispitivala utjecaj etanolnih i metanolnih ekstrakata ljekovite kadulje na vrste *Aphanomyces astaci*, *Phytophthora cactorum* i *Phytophthora plurivora* te se pokazalo da su ekstrakti kadulje imali izražen inhibicijski učinak na micelij vrste *A. astaci*, dok na vrste roda *Phytophthora* nisu djelovali inhibicijski. Nadalje, etanolni ekstrakti biljke *Ruta graveolens*

suzbijaju rast *Saprolegnia* sp., još jednog patogenog vodenog oomiceta srodnog vrsti *A. astaci* (Hashemi Karouei i sur., 2012). Campbell i sur. (2001) ispitivali su u *in vitro* uvjetima antimikrobnu aktivnost 49 različitih kemijskih komponenti svrstanih u pet grupa na rast *Aphanomyces invadans*, patogene oomicete koja napada ribe. Pritom su jednu od grupa činili prirodni pripravci, odnosno ekstrakti raznih biljnih vrsta poput *Acalypha indica* L., *Acalypha lanceolata* Willd., *Curcuma domestica* Val., *Ficus pumila* L. i dr., te ekstrakti propolisa. Analizom dobivenih rezultata najučinkovitijim pripravkom iz ove grupe pokazala se otopina smole propolisa u etanolu, dok je od biljnih ekstrakata najveći inhibicijski učinak na rast *A. invadans* zabilježen u slučaju biljnih vrsta *Calophyllum inophyllum*, *Curcuma domestica*, *Ficus pumila* i *Eugenia caryophyllus*, ali u visokim koncentracijama (5000 ppm.), dok se češnjak pokazao učinkovitim samo pri vrlo visokim koncentracijama (10.000 ppm.). Također, rezultati ovog rada ukazuju na to da kvaliteta vode (pH, temperatura, tvrdoća) uvelike utječe na antimikrobni učinak i toksičnost primjenjenog sredstva na ribe te da stoga nije moguće dati univerzalne preporuke za tretiranje oboljenja uzrokovanih *A. invadans*.

Sve navedeno pokazuje potencijal korištenja biljnih ekstrakata kao sredstva za zaštitu životinja od patogenih oomiceta u slatkovodnoj akvakulturi. Međutim, da bi biljni produkti djelovali pozitivno na vodene organizme, potrebno je voditi računa o tome iz kojeg dijela biljke se ekstrahiraju bioaktivni spojevi, kojom metodom ekstrakcije i koja koncentracija se primjenjuje budući da prevelika koncentracija može štetno djelovati na vodene organizme, to jest imati suprotan učinak od željenog (Reverter i sur., 2014). Također, prije definitivne primjene ekstrakata lovora i drugih biljnih ekstrakata u akvakulturi, potrebno je provesti dodatna istraživanja koja bi pokazala djeluju li ekstrakti, i u kojoj koncentraciji, na zoospore kao infektivni stadij mjereći njihovu pokretljivost i/ili brojnost te djeluju li ekstrakti lovora na druge patogene oomicete iz slatkovodnih ekosustava, primjerice vrste iz roda *Saprolegnia* (Earle i Hintz, 2014). Također, potrebna su, osim *in vitro*, i *in vivo* istraživanja u realnom akvakulturnom postrojenju.

6. Zaključak

Istraživanja antioomicetnih svojstava biljnih ekstrakata su malobrojna te je ovo prvo istraživanje u kojem je testirano djelovanje ekstrakata listova lovora na patogene oomicete *Aphanomyces astaci*, *Phytophthora cactorum* i *Phytophthora plurivora*. Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Ekstrakti lovora djelovali su inhibicijski na rast micelija uzročnika račje kuge, *A. astaci*, čime je pokazan potencijal za njihovu primjenu u slatkovodnoj akvakulturi.
- Inhibicijsko djelovanje ovisilo je korištenom ekstrakcijskom otapalu (96 %-tni etanol, 48 %-tni etanol, 100 %-tni metanol i 50 %-tni metanol) te je ekstrakt lovora u 96 %-tnom etanolu imao najveći inhibicijski utjecaj na rast micelija *A. astaci* (prosječan rast micelija bio je 24 % u odnosu na kontrolu).
- Ekstrakti lovora nisu djelovali inhibicijski na testirane biljne patogene iz roda *Phytophthora*, već su neki ekstrakti čak djelovali blago poticajno na rast micelija (rast micelija od 104 – 121 % u odnosu na negativnu kontrolu). Ovaj rezultat ukazuje na razvoj otpornosti prema djelovanju metabolita lovora, što je u skladu s ekološkom nišom testiranih oomiceta.

7. Popis literature

Afzali S. F., Wong W. L. (2017) *In vitro* screening of *Sonneratia alba* extract against the oomycete fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Iranian Journal of Fisheries Science*. **4**: 1333 – 1340.

Al-Hussaini R., Mahasneh A. M. (2009) Antimicrobial and Antiquorum Sensing Activity of Different Parts of *Laurus nobilis* L. Extracts. *Jordan Medical Journal*. **43 (4)**: 286 – 298.

Bower S. M. (2012): Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Crayfish Plague ("Fungus" Disease), <<http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/cpfdcy-eng.html>> Pristupljeno 1. rujna 2018.

Campbell R. E., Lilley J. H., Tauhid I., dan Perikanan B. K., Panyawachira V., Kanchanakhan S. (2001) *In vitro* screening of novel treatments for *Aphanomyces invadans*. *Aquaculture Research*. **32**: 223 – 233.

Caruana S., Yoon G. H., Freeman M. A., Mackie J. A., Shinn A. P. (2012) The efficacy of selected plant extracts and bioflavonoids in controlling infections of *Saprolegnia australis* (Saprolegniales; Oomycetes). *Aquaculture*. **358 – 359**: 146 – 154.

Crepel C., Inghelbrecht S., Baeyen S., Bobev S. (2005) First Report of Leaf Spots on *Laurus nobilis* Caused by *Phytophthora citricola* in Belgium. *Plant Disease*. **89 (1)**: 107 – 107.

Curtis H., Noll U., Störmann J., Slusarenko A. J. (2004) Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **65**: 79 – 89.

Dadalioglu I., Evrendilek G. A. (2004) Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52 (26)**: 8255 – 8260.

Dagostin S., Formolo T., Giovannini O., Pertot I., Schmitt A. (2010) *Salvia officinalis* extract can protect grapevine against *Plasmopara viticola*. *Plant Disease*. **94**: 575 – 580.

Derevnina L., Petre B., Kellner R., Dagdas Y. F., Sarowar M. N., Giannakopoulou A., De la Concepcion J. C., Chaparro-Garcia A., Pennington H. G., van West P., Kamoun S. (2016) Emerging oomycete threats to plants and animals. *The Royal Society Publishing*. **371**: 20150459.

Dudaš S., Venier L. (2009) Varijabilnost sadržaja eteričnog ulja u listovima lovora *Laurus nobilis* L. *Glasnik zaštite bilja*. **6/2009**: 46 – 54.

Earle G., Hintz W. (2014) New Approaches for Controlling *Saprolegnia parasitica*, the Causal Agent of a Devastating Fish Disease. *Tropical Life Sciences Research*. **25 (2)**: 101 – 109.

El Malti J., Amarouch H. (2009) Antibacterial effect, histological impact and oxidative stress studies from *Laurus nobilis* extract. *Journal of Food Quality*. **32 (2)**: 190 – 208.

Fawke S., Doumane M., Schornack S. (2015) Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*. **79 (3)**: 263 – 280.

Fry W.E., Grünwald N.J. (2010) Introduction to Oomycetes. The Plant Health Instructor; <<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroOomycetes.aspx>> Pristupljeno 1. rujna 2018.

Goudjil M. B., Ladjel S., Bencheikh S. E., Zighmi S., Hamada D. (2015) Study of the chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil extracted from the leaves of Algerian *Laurus nobilis* Lauraceae. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **7(1)**: 379 – 385.

Grenville-Briggs L. J., Kushwaha S. K., Cleary M. R., Witzell J., Savenkov E. I., Whisson S. C., Chawade A., Vetukuri R. R. (2017) Draft genome of the oomycete pathogen *Phytophthora cactorum* strain LV007 isolated from European beech (*Fagus sylvatica*). *Genomics Data*. **12**: 155 – 156.

Habrún B. (2009) Biološke opasnosti u hrani. 1. dio Bakterije. Biološke opasnosti u hrani, Hengl B., Gorski D., ur., Osijek: Hrvatska Agencija za hranu, str. 9 – 57.

Hansen E. M. (2015) *Phytophthora* Species Emerging as Pathogens of Forest Trees. *Current Forestry Reports*. **1 (1)**: 16 – 24.

Hashemi Karouei S. M., Sadeghpour Haji M., Gholampour Azizi I. (2012) Isolation of *Saprolegnia* and the Influence of Root Ethanolic Extract of *Ruta graveolens* on *Saprolegnia* spp. Growth. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. **2 (1)**: 64 – 67.

Heffer Link V., Powelson M.L., Johnson K.B. (2002) Oomycetes. The Plant Health Instructor;
<<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/LabExercises/Pages/Oomycetes.aspx>>
Pristupljeno 1. rujna 2018.

Hudler G. W. (2013) *Phytophthora cactorum*. *Forest Phytophthoras*. **3**: 1.

Juergens U. R. (2014) Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1.8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. *Drug research*. **64 (12)**: 638 – 646.

Jung I., Burgess T. I. (2009) Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. *Persoonia*. **22**: 95–110.

Jung T., Orlikowski L., Henricot B., Abad-Campos P., Aday A. G., Aguin Casal O., Bakonyi J., Cacciola S. O., Cech T., Chavarriaga D., Corcobado T., Cravador A., Decourcelle T., Denton G., Diamandis S., Doğmuş-Lehtijärvi H. T., Franceschini A., Ginetti B., Green S., Glavendekić M., Hantula J., Hartmann G., Herrero M., Ivic D., Horta Jung M., Lilja A., Keca N., Kramarets V., Lyubenova A., Machado H., Magnano di San Lio G., Mansilla Vázquez P. J., Marçais B., Matsiakh I., Milenkovic I., Moricca S., Nagy Z. Á., Nechwatal J., Olsson C., Oszako T., Pane A., Paplomatas E. J., Pintos Varela C., Prospero S., Rial Martínez C., Rigling D., Robin C., Rytkönen A., Sánchez M. E., Sanz Ros A. V., Scanu B., Schlenzig A., Schumacher J., Slavov S., Solla A., Sousa E., Stenlid J., Talgø V., Tomic Z., Tsopelas P., Vannini A., Woodward S., Pérez-Sierra A. (2015) Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. *Forest Pathology*. **46**: 134 – 163.

Jussila J., Makkonen J., Vainikka A., Kortet R., Kokko H. (2011) Latent crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) infection in a robust wild noble crayfish (*Astacus astacus*) population. *Aquaculture*. **321**: 17 – 20.

Kamoun S. (2003) Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes. *Eucaryotic Cell*. **2 (2)**: 191 – 199.

Kilic A., Hafizoglu H., Kollmannsberger H., Nitz S. (2004) Volatile constituents and key odorants in leaves, buds, flowers, and fruits of *Laurus nobilis* L.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52 (6)**: 1601 – 1606.

Kivrak S., Göktürk T., Kivrak I. (2017) Assessment of Volatile Oil Composition, Phenolics and Antioxidant Activity of Bay (*Laurus nobilis*) Leaf and Usage in Cosmetic Applications. *International Journal of Secondary Metabolite*. **4 (2)**: 148 – 161.

Lévesque C. A. (2011) Fifty years of oomycetes—from consolidation to evolutionary and genomic exploration. *Fungal Diversity*. **50**: 35 – 46.

Majcen D. (2003) ELECTISÒ 76 WG-new fungicide on the basis of novel compound zoxamide and mancozeb provides efficient control of potato late blight and downy mildew of grape. In *6th Slovenian Conference on Plant Protection (6. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin)*.

Martín-Torrijos L., Kawai T., Makkonen J., Jussila J., Kokko H., Diéguez-Uribeondo J. (2018) Crayfish plague in Japan: A real threat to the endemic *Cambaroides japonicus*. *PLOS ONE*. **13(4)**: e0195353.

Milenković I., Keča N., Karadžić D., Nowakowska J. A., Borys M., Sikora K., Oszako T. (2012) Incidence of *Phytophthora* species in beech stands in Serbia. *Folia Forestalia Polonica, Series A - Forestry*. **54 (4)**: 223 – 232.

Mrázková M., Černý K., Tomšovský M., Strnadová V. (2011) *Phytophthora plurivora* T. Jung & T. I. Burgess and other *Phytophthora* species causing important diseases of ericaceous plants in the Czech Republic. *Plant Protect. Sci*. **47**: 13–19.

Ogle H. (1997) Disease management: Chemicals. *Plant Pathogens and Plant Diseases*, Brown J., Ogle H., Rockvale Publications. str. 373 – 389.

Orlikovski L. B., Ptaszek M., Rodziewicz A., Nechwatal J., Thinggaard K., Jung T. (2011) *Phytophthora* root and collar rot of mature *Fraxinus excelsior* in forest stands in Poland and Denmark. *Forest Pathology*. **41**: 510 – 519.

Pagliarulo C., Sateriale D., Scioscia E., De Tommasi N., Colicchio R., Pagliuca C., Scaglione E., Jussila J., Makkonen J., Salvatore P., Paolucci M. (2018) Growth, Survival and Spore Formation of the Pathogenic Aquatic Oomycete *Aphanomyces astaci* and Fungus *Fusarium avenaceum* Are Inhibited by *Zanthoxylum rhoifolium* Bark Extracts *In Vitro. Fishes*. **3 (1)**: 12.

Peiró D. F., Almerão M. P., Delaunay C., Jussila J., Makkonen J., Bouchon D., Araujo P. B., Souty-Grosset C. (2016) First detection of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in South America: a high potential risk to native crayfish. *Hydrobiologia*. **781 (1)**: 181 – 190.

Reverter M., Tapissier-Bontemps N., Lecchini D., Sasal P. (2014) Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*. **433**: 50 – 61.

Rivard C. (2007) Pathogen Profile: *Phytophthora cactorum*. Department of Plant Pathology, North Carolina State University
<<https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/cactorum/Pcactorum.html>> Pristupljeno 1. rujna 2018.

Rodino S., Dobre A., Butu M. (2013) Screening of some indigenous plants for identifying the inhibitory effect against *Phytophthora infestans*. *Vasile Goldis University Press*. **23**: 483 – 486.

Schoebel C. N., Stewart J., Gruenwald N. J., Rigling D., Prospero S. (2014) Population History and Pathways of Spread of the Plant Pathogen *Phytophthora plurivora*. *PLOS ONE*. **9 (8)**: e85368.

Simić M., Kundaković T., Kovacević N. (2003) Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia*. **74 (6)**: 613 – 616.

Soldo T., Svitlica B., Mesić J. (2015) *Phytophthora cactorum* na jabukama - simptomi, biologija patogena, epidemiologija i kontrola bolesti. *Glasilo biljne zaštite*. **15**: 24-30.

Soylu E. M., Soylu S., Kurt S. (2006) Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Various Plants against Tomato Late Blight Disease Agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*. **161 (2)**: 119 – 128.

Srivastava S., Sinha R., Roy D. (2004) Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology*. **66 (3)**: 319 – 329.

Staub T. H., Hubele A. (1981) Insecticides · Bactericides · Oomycete Fungicides / Biochemical and Biological Methods · Natural Product, Wegler R., ur., str. 389 – 422.

Škof M. (2018) Utjecaj ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) na patogene mikroorganizme iz skupine Oomycetes. Završni rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Tkaczyk M., Sikora K., Nowakowska J. A. (2016) Four different *Phytophthora* species that are able to infect Scots pine seedlings in laboratory conditions. *Folia Forestalia Polonica, Series A – Forestry*. **58 (3)**: 123 – 130.

Tomić Ž. (2015) *Phytophthora fragariae* Hickman i *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt na jagodi. *Glasilo biljne zaštite*. **15**: 369-375.

Van den Berg A.H., McLaggan D., Diéguez-Urbeondo J., Van West, P. (2013) The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biology Reviews*. **27**: 33-42.

Van West P. (2006) *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist*. **20**: 99-104.

Vrålstad T., Johnsen S. I., Taugbøl T. (2011): NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Aphanomyces astaci*.

<https://www.nobanis.org/globalassets/speciesinfo/a/aphanomyces-astaci/aphanomyces_astaci.pdf> Pristupljeno 1. rujna 2018.

Weiland J .E., Nelson A. H., Hudler G. W. (2010) Aggressiveness of *Phytophthora cactorum*, *P. citricola* I, and *P. plurivora* from European Beech. *Plant Disease*. **94**: 1009 – 1014.

Yusuf Y., Durdane Y., Servet A. (2005) Antifungal Activity of Turkish Propolis Against *Phytophthora* Species. *Plant Pathology Journal*. **4**: 58-60.

Zanzotto A., Morroni M. (2016) Major Biocontrol Studies and Measures against Fungal and Oomycete Pathogens of Grapevine,

<https://cab.presswarehouse.com/sites/stylus/resrcs/chapters/1780647123_1stChap.pdf

> Pristupljeno 1. rujna 2018.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Tamara Vujanić

ime i prezime studenta